

## 研究資料

# 黒ダイズ (*Glycine max*, Merrill. forma *Kuromame* Makino) のトリプシンインヒビターについて

荒 堀 圭 子, 岡 野 充 子

Tripsin Inhibitors of Soybean (*Glycine max*, Merrill. forma *Kuromame* Makino)

Keiko Arahori, Mitsuko Okano

動植物の組織中には、トリプシンをはじめとする哺乳動物のタンパク質消化酵素の働きを阻害する物質 (プロテアーゼインヒビター) が存在する。これらプロテアーゼインヒビターは、それら自身がタンパク質であり、多くの食品材料中に含まれているため、食品学、栄養学をはじめ生化学、農学、医学など多くの分野の研究者の関心を集めている。植物性食品のプロテアーゼインヒビターの研究は、1946年に Kunitz<sup>1)</sup> が、大豆よりトリプシンインヒビターを単離して以来、著しい進展がみられ、豆類、種子類、蔬菜類をはじめ種々の植物性食品材料中からインヒビターが単離され、それらの性質が明らかにされている。

われわれは、わが国の限られた地域で生産され、古くから親しまれている黒ダイズの成分に興味をもち、特にその中のトリプシンインヒビターについて検討し、2, 3の知見を得ましたので、その結果とともに従来より研究されているダイズのインヒビターについて紹介するべく本資料を作成しました。

### I. 黒ダイズについて

黒ダイズは、ダイズの一種である。ダイズは、現在世界各国で、食糧、飼料として利用されている主要植物性食品であり、その原産地は東南アジアといわれている。わが国、中国、その他アジア各地では古くから食用に供せられ、重要なタンパク質源となっていた。その栽培の歴史は極めて古いが、栽培地域はアジアに

限られていた。ダイズが欧米に伝わって栽培されるようになったのは比較的近年のことである。とくにアメリカが世界最大のダイズ生産国になったのは、ここ30余年のことである。このように世界各国で栽培されるようになったのは、ダイズがさまざまな気象条件や土壌条件に適応するとともに、品種の選定と適当な栽培管理を講ずれば、どこでも栽培が可能な植物であるためである。そのためダイズは品種の分化が進み、わが国で栽培されているダイズも長年にわたって種々の栽培条件により著しい分化がおこり、現在多数の品種がある<sup>2)</sup>。それぞれの地方に根強く残っているこれらの品種は、その土地に対する適応性が高く、その風土に慣らされた品種である。ダイズの品種はその種実の形態 (種皮や臍の色、種実や莢の形など) および栽培、利用面 (栽培の季節、産地、脂質・タンパク質・炭水化物などの成分含量など) から分類され、極めて多岐にわたっている。

黒ダイズ (*Glycine max*, Meer. forma *Kuromame* Makino) は、一般に黒豆と呼ばれわが国では煮豆にされ、おせち料理のひとつとして親しまれている。ダイズの栄養的に優れた成分を含むとともに解毒効果や咳止めなどの薬効を持つといわれ、古くから生薬として用いられている。わが国では、北海道産の夏大豆と近畿産の秋大豆の2種類が代表的であり、とくに後者は大粒で良質なため丹波黒と呼ばれ親しまれている。成分はタンパク質22~29%、脂質18~22%、灰分は4.5~5%である。とくにタンパク質の構成アミノ酸が動物性タンパク質に似ており、リジン、アルギニンなど

が多い。また植物性タンパク質としての特徴であるグルタミン酸の含量も多い。その他、特異な品種には他品種には認められない特異成分が含まれ、これらの成分研究は極めて興味深い。

## II. ダイズのトリプシンインヒビターについて

今世紀のはじめ頃より生ダイズで飼育したラットは、加熱ダイズを与えたものと比較すると著しく成長抑制のおこることが知られていた。この熱不安定成長抑制因子のひとつが1946年、Kunitzがダイズより結晶状にとり出したダイズトリプシンインヒビター (STI) である。ダイズからはさらに60%アルコールに可溶、アセトンに不溶なインヒビターが、Bowman<sup>3)</sup> により見い出され、Birkら<sup>4)</sup>により単離された。このインヒビターははじめ“acetone-alcohol-insoluble-inhibitor”と名付けられたが、現在では、Bowman-Birk インヒビター (BBI) と呼ばれている。この2種類がダイズの代表的なインヒビターとして多くの研究がなされている。その後、Racksら<sup>5)</sup>は、SBTIA<sub>1</sub>、SBTIA<sub>2</sub>、SBTIB<sub>1</sub>、SBTIB<sub>2</sub>と4種類のインヒビターを単離した。このうちSBTIA<sub>2</sub>は、Kunitzのインヒビターと同一物であることがわかったが、他の3品種は新種のインヒビターであった。また、Frattali<sup>6)</sup>は市販のKunitzインヒビター製品から、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub>の3種類のインヒビターを分画し、そのうち主インヒビターであるF<sub>2</sub>は、Kunitzインヒビターであったが、残りの2種類は新しいインヒビターであった。これらの結果よりダイズから、STI、BBT、SBTIA<sub>1</sub>、SBTIB<sub>1</sub>、SBTIB<sub>2</sub>、F<sub>1</sub>、F<sub>3</sub>の7種類のトリプシンインヒビターが単離された。さらに、小原ら<sup>7)</sup>は、ダイズのトリプシンインヒビターの種類について、Sephadex G-75によるゲル濾過およびポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて総合的な検討を行ない、ダイズ中に7~10種類のトリプシンインヒビターが存在することを報告している。最近小谷ら<sup>8)</sup>は、C-II、D-II、E-Iの3種類の新しいインヒビターを単離し、その性質を明らかにしている。また越山ら<sup>9)</sup>はダイズの2Sグロブリン画分より得られたタンパク質 $\alpha_2$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_4$ がトリプシンに対して阻害活性を示すことを報告している。なぜこのようにダイズ中に数多くのトリプシンインヒビターが存在するかの疑問について「遺伝的不均一性による」<sup>6)</sup>とか「ダイズの品種に遺伝的変異がある」<sup>10)</sup>といっている研究者があるが、各説とも憶測の段階である。

ダイズのこのような多くのインヒビターのうち、物理化学的性質について詳しく研究されているのはSTIとBBIの2種類であるが、STIは熱、pH変化に対して失活しない安定なタンパク質である。30℃以下ではpH 1~12までの広範囲で安定であるとともに80℃に加熱しても室温にもどすと、元の阻害活性を示す。分子量は、アミノ酸配列決定より20,100<sup>11)</sup>であることが確定された。またヘリックス構造をもたない球状タンパク質であることが多くの研究報告で立証されている。その立体構造はち密でなく、ほとんど規則性のないランダムコイル状であることが旋光分散分析から示唆されている<sup>12)</sup>。しかし円偏光二色性の研究から、未変性状態でのこのタンパク質は、 $\alpha$ -ヘリックスや $\alpha$ -構造とも異なる特別の構造をとっていることが示されている<sup>13)</sup>。これに対してBBIは可逆的に解離会合するタンパク質で、分子量8,000<sup>14)</sup>、そのアミノ酸組成は、トリプトファンやグリシンを全く含まず、シスチン量が約20%である<sup>15)</sup>。これは5個のアミノ酸残基あたり1個の $\frac{1}{2}$ シスチンが存在し、それらが-S-S-結合を形成しているので、非常に安定な三次元構造を保っている。このため100℃で10分間の加熱にも失活は認められない。これらふたつのインヒビターの一次構造が明らかにされているとともにその作用機構についても多くの報告および総説<sup>16)</sup>があり、詳しく知るためにはそれらを参照されたい。

また栄養学的立場からは生ダイズの生体に与える影響が研究されている。生ダイズを雛、マウス、ラットに与えると、発育阻害、食餌の同化エネルギーの低下、脂肪吸収量の減少、脾臓の肥大、脾液の過大分泌などをひきおこす。さらにラットに生ダイズを与え続けると、他の組織の酵素系には変化がみられないが、腎臓のトランスアミナーゼ活性が減少する。このような生理的影響を与える要因のほとんどが生ダイズの豆乳区分に含まれており、この区分を加熱すると、これらの要因は消失してしまう。この豆乳区分はダイズタンパク質の6~8%を占めており<sup>17)</sup>、STI、BBI、SBTIA<sub>1</sub><sup>18)</sup>などのインヒビターは、すべてこの区分に含まれている。この豆乳をラットに与えた場合と生ダイズをラットに与えた場合には、程度の差はあるが、ほとんど同じような生理的影響を与える。

ラットを用いての比較実験で、STIをラットに与えると脾臓肥大をおこすなど、生ダイズを与えた場合の30~60%の発育阻害をひき起こした<sup>19)</sup>。またSTIを雛に与えると、その発育速度の抑制、代謝エネルギーの減少、脾臓肥大をひき起こすことが確認されている。

さらに豆乳からこれらのインヒビターを除いて得られた画分は、ラット、マウスにトリプシンインヒビターを与えた場合における抗栄養的影響を助長させることがわかっている。

以上のことより生ダイズによる発育抑制は以下の原因が考えられる。

- 1) トリプシンインヒビターが膵臓の肥大とトリプシンなどのタンパク質分解酵素の合成を促してアミノ酸の要求を増大させ、結果的に内因性窒素の損失をもたらすこと。
- 2) 生ダイズ中には消化性の低いタンパク質区分が含まれていること。これは加熱すると消化性となるが、この区分の存在は生ダイズ自身の消化性の低いこと、および生ダイズは、トリプシンインヒビターを添加した加熱ダイズよりもさらに大きい発育抑制効果のあることなどより推察される。

生ダイズの発育抑制は、この2種類の機構が原因するのではないかと Gertler ら<sup>21)</sup>は推論している。

以上、ダイズのトリプシンインヒビターについては、広範囲な研究が行なわれている。これらの研究結果をふまえて、わが国の近畿地方という限られた地域だけに生産されている黒ダイズのトリプシンインヒビターについて検討を試みた。

### Ⅲ. 黒ダイズのトリプシンインヒビター

試料として、1978年度兵庫県丹波産、丹波黒種の黒ダイズを入手し、脱脂、粉碎して使用した。Sephadex G-75 (Super Fine)、DEAE-Sephadex A-25は、Pharmacia Fine Chemical Co. 製品を、トリプシンはSigma Chemical Co. 製品、 $\alpha$ -N-Benzoyl-D.L.-Arginine-p-Nitro anilide HCl (以下 BANA) は、財団法人、蛋白質研究奨励会の製品を、それぞれ用いた。その他の試薬は市販特級試薬を使用した。

トリプシンに対する阻害活性の測定は、BANAを基質として測定した<sup>22)</sup>。純度の確認および分子量の測定は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた<sup>23)</sup>。単離したインヒビターのアミノ酸組成の分析は、試料に6M-HClを加え、110°Cで24時間加水分解して、835型日立高速アミノ酸分析機で分析した。

脱脂黒ダイズ末100g に約10倍量の0.1M-NaCl 溶液を加え、可溶成分を抽出した。その後60°Cで5分間の熱処理を行ない、熱に不安定なアルブミン系のタンパク質を除いた。次にこの熱処理液を遠心分離し、得られた上清液に硫酸アンモニウムを100%飽和になるま

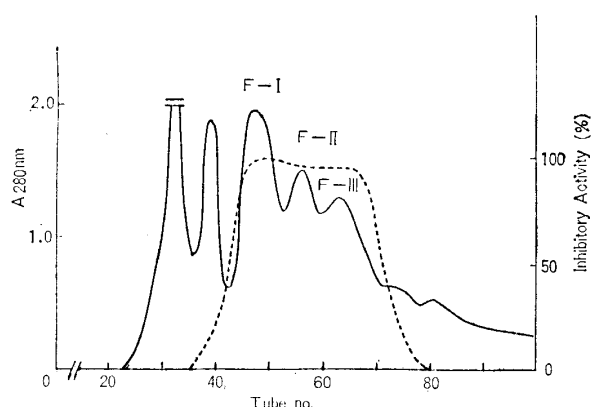


図1 Sephadex G-75 (Super Fine) カラム (1.8 × 100cm) による粗製トリプシンインヒビターの分画。

粗製トリプシンインヒビター140mgを0.1 M Tris-HCl (pH8.0) に溶かし、Sephadex G-75 カラムに加え、0.1M-Tris-HCl で溶出し、1画分3 mlで分画した。

—— 280nmの吸収  
---- 阻害活性率

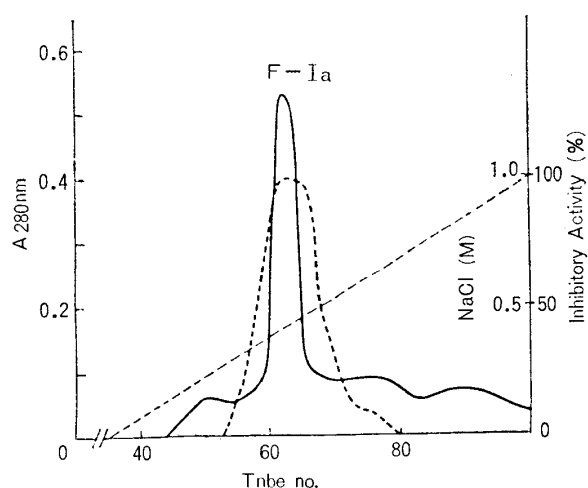


図2 DEAE-Sephadex A-25カラム (2.0 × 30.3cm) によるF-Iのクロマトグラム。

F-I 20mgを0.1M-Tris-HCl (pH8.0) に溶かし、DEAE-Sephadex A-25カラムに加え、食塩濃度0から1Mの濃度勾配で溶出し、1画分3 mlで分画した。

—— 280nmの吸収    ..... 阻害活性率  
---- 食塩濃度

で加え、塩析を行なった。沈殿を濾集し、少量の水にとかし、蒸留水に対し透析を行なった。透析内液を遠心分離 (10,000回転, 10分間) し、上清を凍結乾燥して粗製トリプシンインヒビターを得た。さらにこの粗製トリプシンインヒビターをSephadex G-75 (Super Fine) カラムにより分離した結果、タンパク質の吸収とインヒビターの活性の重なる3つのフラクションを

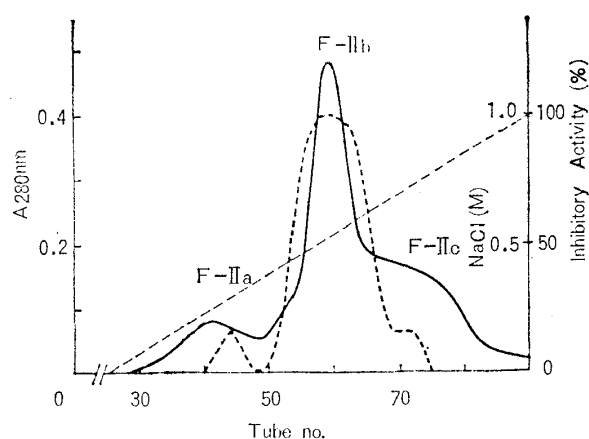


図3 DEAE-Sephadex A-25 カラム (2.0×30.3 cm) によるF-IIのクロマトグラム。

図2と同条件。

得た(図1)。それぞれを、F-I、F-II、F-IIIとした。F-IおよびF-IIは、DEAE-Sephadex A-25カラムによってさらに精製をすすめた。F-Iについては図2に示すごとく、強い活性を示すフラクションを得、これをF-I<sub>a</sub>とした。F-IIについては、図3に示すごとく3つの活性を示すフラクションを得、それぞれ、F-II<sub>a</sub>、F-II<sub>b</sub>、F-II<sub>c</sub>とした。

カラムクロマトグラフィーで得た各フラクションの純度を調べるために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった。F-I<sub>a</sub>、F-IIIは、電気泳動的に均一であった。しかし他の画分については均一なものを得られなかった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、分子

表1 アミノ酸組成

Amino Acid	F-I <sub>a</sub>	F-III	STI
Aspartic acid	14.8	14.1	14.5
Threonine	4.4	5.1	3.9
Serine	6.0	10.7	6.2
Glutamic acid	11.1	13.6	10.1
Glycine	9.3	5.0	8.9
Alanine	4.9	6.7	4.5
½ Cystine	1.2	6.0	2.2
Valine	6.9	2.4	7.8
Methionine	0.6	2.3	1.1
Isoleucine	7.6	2.8	7.8
Leucine	6.8	4.2	8.4
Tyrosine	1.8	2.6	2.2
Phenylalanine	5.6	2.3	5.0
Lysine	5.8	6.8	5.6
Histidine	1.9	2.3	1.1
Arginine	5.9	5.4	5.0
Proline	5.6	8.2	5.6

(mole %)

量は、F-I<sub>a</sub> 18,000、F-III 17,500と推定された。

BANA法を用いてトリプシンに対する阻害活性を調べたところ、重量比でトリプシン1に対し、F-I<sub>a</sub>、F-IIIはそれぞれ0.779、0.758の割合でトリプシン活性を100%阻害するという結果を得た。

アミノ酸組成の分析を行なった結果は表1に示す。表の右側にダイズ中の代表的なインヒビターであるSTIを示した。F-I<sub>a</sub>はSTIとほぼ等しい組成を示し、F-I<sub>a</sub>はSTIであると推定した。F-IIIはF-I<sub>a</sub>に比べ、セリン、アラニン・シスチン、プロリンの含有率が高く、グリシン、バリン、イソロイシン、フェニールアラニンが低い値を示した。

#### IV. おわりに

以上、ダイズトリプシンインヒビターについての紹介と黒ダイズ中のトリプシンインヒビターの単離についてわれわれの実験結果を示した。すでにダイズ中には、6～10種のインヒビターの存在が確認されているが、われわれのデーターでは、黒ダイズ中に、5種類以上のインヒビターの存在を認めた。このようなインヒビターが植物体に存在する意義については、一般には、

- 1) 植物体中のタンパク質の合成、代謝の調整
- 2) 自己分解防止
- 3) 昆虫、動物などからの防御

などであると言われている。またこれらの説を推察させるデーターは示されているが、現在まで明確な解答は与えられておらず、インヒビター研究の一課題である。

ダイズは植物性タンパク質源として、極めて重要な食品であり、種々の調理法、加工法により、われわれの食卓にのせられている。その際のインヒビターの挙動については、加工面よりの検討は比較的行なわれているが、これらは主としてオートクレーブ熱処理など、温度によるインヒビターの失活と栄養面との関連で検討される。しかし、生ダイズを他の食品材料、調味料などとの共存下で調理した時のインヒビター活性の挙動については、ほとんどデーターが認められず、調理学の立場からのダイズトリプシンインヒビターの挙動もわれわれにとって、興味深い研究課題である。

最後に、本資料作成にあたり、御指導下さいました本学光永助教授に深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

## ○ 単行本

## 大豆食品

渡辺篤二, 海老根英雄, 太田輝夫, 光琳書院。

Soybean: Chemistry and Technology. ed. by A.K. Smith and S.J. Circle, Avi publishing Co. (1972)

Proteinase Inhibitors (Proceedings of the 2nd International Research Conference).

ed. by H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene and E. Truscheit, Springer Verlag (Berlin).

Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, ed. by I.E. Liener. Academic press (New York) (1969)

- 1) M. Kunitz: *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149 (1946).
- 2) 御子紫公人: 昭和56年日本農芸化学会大会講演要旨, p. 595.
- 3) D.E. Bowman: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **63**, 547 (1946).
- 4) Y. Birk, A. Gertler and S. Khalof: *Biochem. J.*, **87**, 281 (1963).
- 5) ① J. Rocks, H.A. Sasame, R.L. Anderson and A.K. Smith: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6265 (1953).  
 ② J. Racks and R.L. Anderson: *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 471 (1962).  
 ③ J. Racks and R.L. Anderson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 230 (1964).
- 6) V. Frattali and R.F. Steiner: *Biochemistry*, **7**, 521 (1968).
- 7) T. Obara, M. Kimura, T. Kobayashi and Y. Watanabe: *Cereal Chem.*, **47**, 597 (1970).
- 8) S. Odani and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **82**, 1513 (1977).
- S. Odani and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **82**, 1523 (1977).
- S. Odani and T. Ikenaka: *J. Biochem.*, **83**, 737 (1978).
- 9) ① I. Koshiyama, M. Kikuchi, K. Harada and D. Fukushima: *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 336 (1981).  
 ② I. Koshiyama, M. Kikuchi and D. Fukushima: *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 340 (1981).
- 10) L. Singh, C.M. Wilson and H.H. Hadley: *Crop Sci.*, **9**, 489 (1969).
- 11) T. Koide and T. Ikenaka: *Eur. J. Biochem.*, **32**, 401 (1973).
- 12) B. Jirgensons: *J. Biol. Chem.*, **242**, 912 (1967).
- 13) B. Jirgensons, M. Kawabata and S. Capetillo: *Makromol. Chem.*, **125**, 126 (1969).
- 14) D.B. Millar, B.E. Willick, R.F. Steiner and V. Frattali: *J. Biol. Chem.*, **244**, 281 (1969).
- 15) V. Frattali: *J. Biol. Chem.*, **244**, 274 (1969).
- 16) 小谷武比古, 池中徳治: 蛋白質・核酸・酵素, **17**, 270 (1972).  
 池中徳治, 小出武比古: 化学と生物, **8**, 1 (1970).
- 17) J.J. Racks, H.A. Sasame and A.K. Smith: *Cereal Chem.*, **40**, 531 (1963).
- 18) R.L. Lyman, S.S. Wilcox and E.R. Monsen: *Am. J. Physiol.*, **202**, 1077 (1962).
- 19) J.J. Racks: *Federation Proc.*, **24**, 1488 (1965).
- 20) J.D. Garlich and M.C. Nesheim: *J. Nutr.*, **88**, 100 (1966).
- 21) A. Gertlek, Y. Birk and A. Bondi: *J. Nutr.*, **91**, 358 (1967).
- 22) B.F. Erlanger, N. Kokowsky and W. Cohen: *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 271 (1961).
- 23) A.L. Shapiro, E. Vinnela and J.V. Maziell: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815 (1967).